

Histidina quinasa: Una proteína que se autofosforila, fosfotransfiere y defosforila

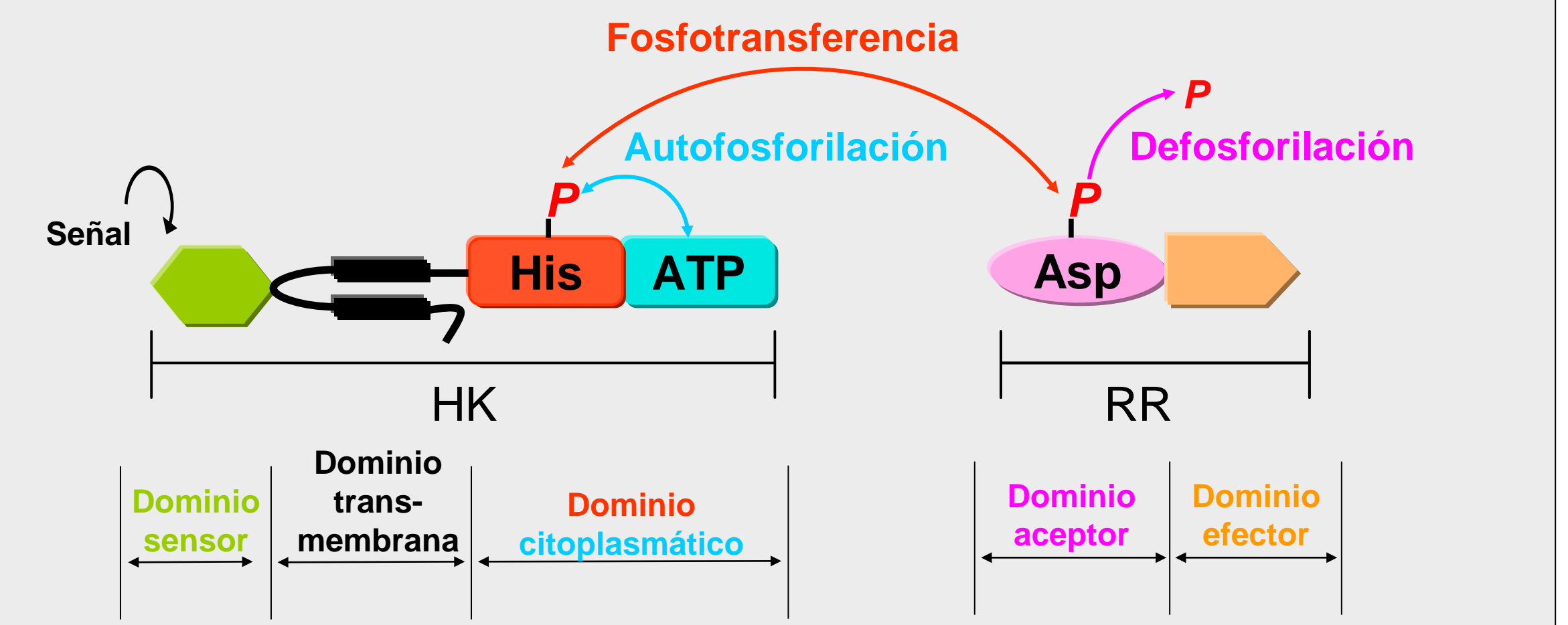
Patricia Casino y Alberto Marina

Departamento de Genómica y Proteómica, Laboratorio de Cristalografía de Macromoléculas
Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Ciberer. (amarina@ibv.csic.es)

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de dos componentes son el mecanismo principal de transducción de señal en microorganismos. Un sistema paradigmático se compone de dos proteínas: una histidina quinasa homodimérica (HK) y un regulador de la respuesta (RR). El mecanismo de transducción de señal implica al menos tres reacciones (ver esquema):

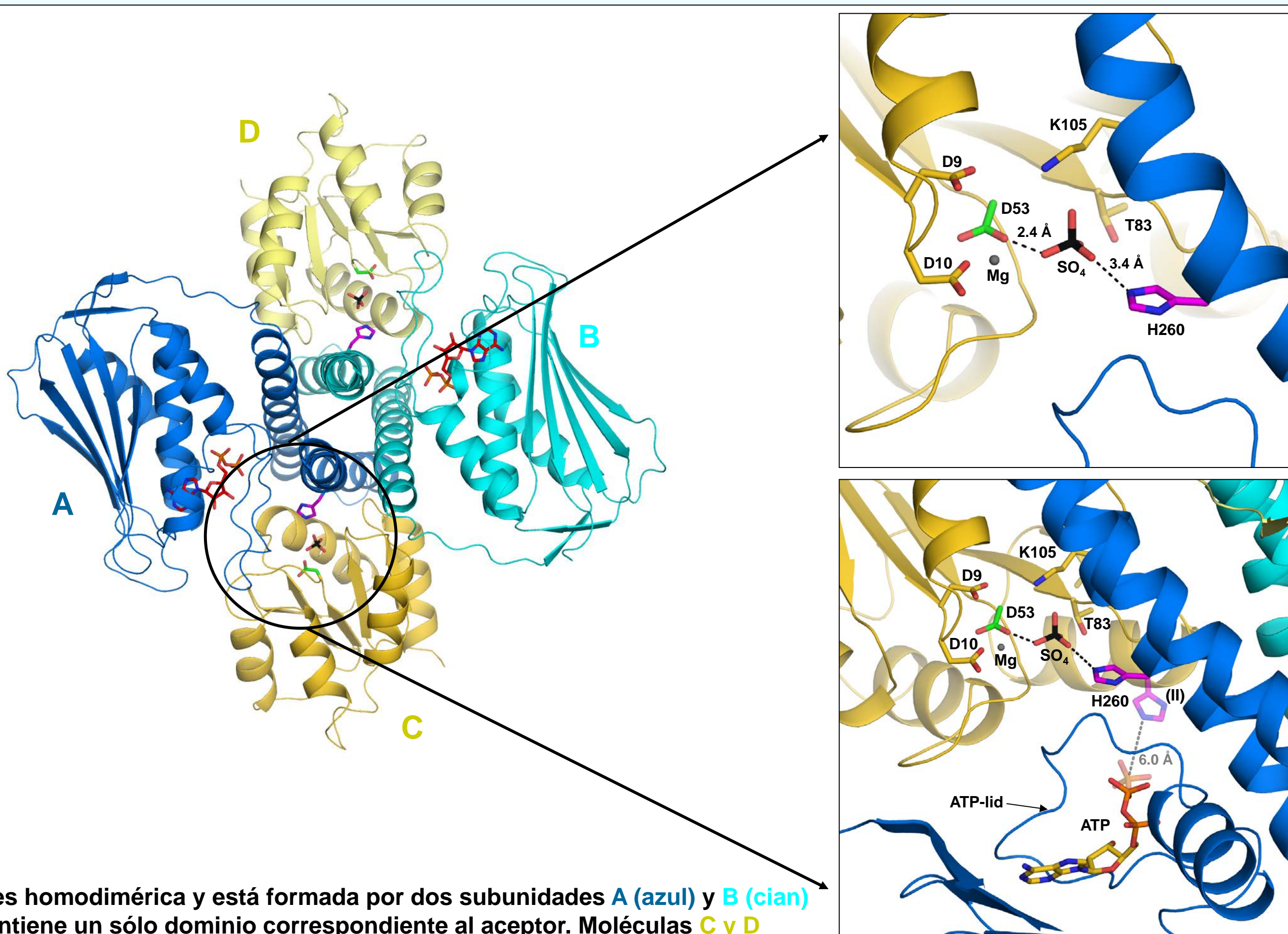
- 1) **Autofosforilación**: el estímulo reconocido por el dominio extracelular sensor de la HK, modula la *trans*-fosforilación en un residuo de His conservado en el dominio de dimerización (DHP) de una subunidad por parte del dominio de unión de ATP (CA) de la otra subunidad en el dímero.
 - 2) **Fosfotransferencia**: este grupo fosforilo es transferido desde la His a un residuo de Asp del dominio aceptor del correspondiente RR.
 - 3) **Defosforilación**: el RR pierde el grupo fosforilo espontáneamente o mediado por la HK. El estado de fosforilación del dominio aceptor en el RR regula la actividad de su dominio efector, que es habitualmente un factor de transcripción.
- Con la intención de conocer el mecanismo de estas reacciones a nivel molecular hemos resuelto la estructura tridimensional del complejo formado por el dominio citoplasmático completo de la HK HK853 (HK853_{CP}) de *Thermotoga maritima* en complejo su RR RR468. La comparación de dicha estructura con la de HK853_{CP} en solitario ha permitido deducir valiosa información funcional y estructural. Por otra parte, la realización de ensayos bioquímicos nos han permitido dilucidar el mecanismo de la reacción de autofosforilación.



CENTRO ACTIVO DEL COMPLEJO FORMADO ENTRE UNA HK Y SU RR

Al observar la estructura del centro activo del complejo HK853_{CP}:(RR468)₂ advertimos dos cosas:

- 1) la presencia de un sulfato que emula a un fosforilo a una distancia de enlace entre la His260 catalítica de HK853 y el Asp53 catalítico de RR468. Dichas distancias permiten proponer un mecanismo disociado para la reacción de fosfotransferencia además de sugerir que la estructura del centro activo se corresponde con la reacción de defosforilación.
- 2) la presencia de una molécula de ADP en el sitio de unión de nucleótido cercana a la His260 aceptora dentro de una misma subunidad, ha permitido proponer un mecanismo de *cis*-autofosforilación (En semitransparente se muestra el posible mecanismo de autofosforilación entre conformero (II) de la His260 y el fosfato y del ATP).



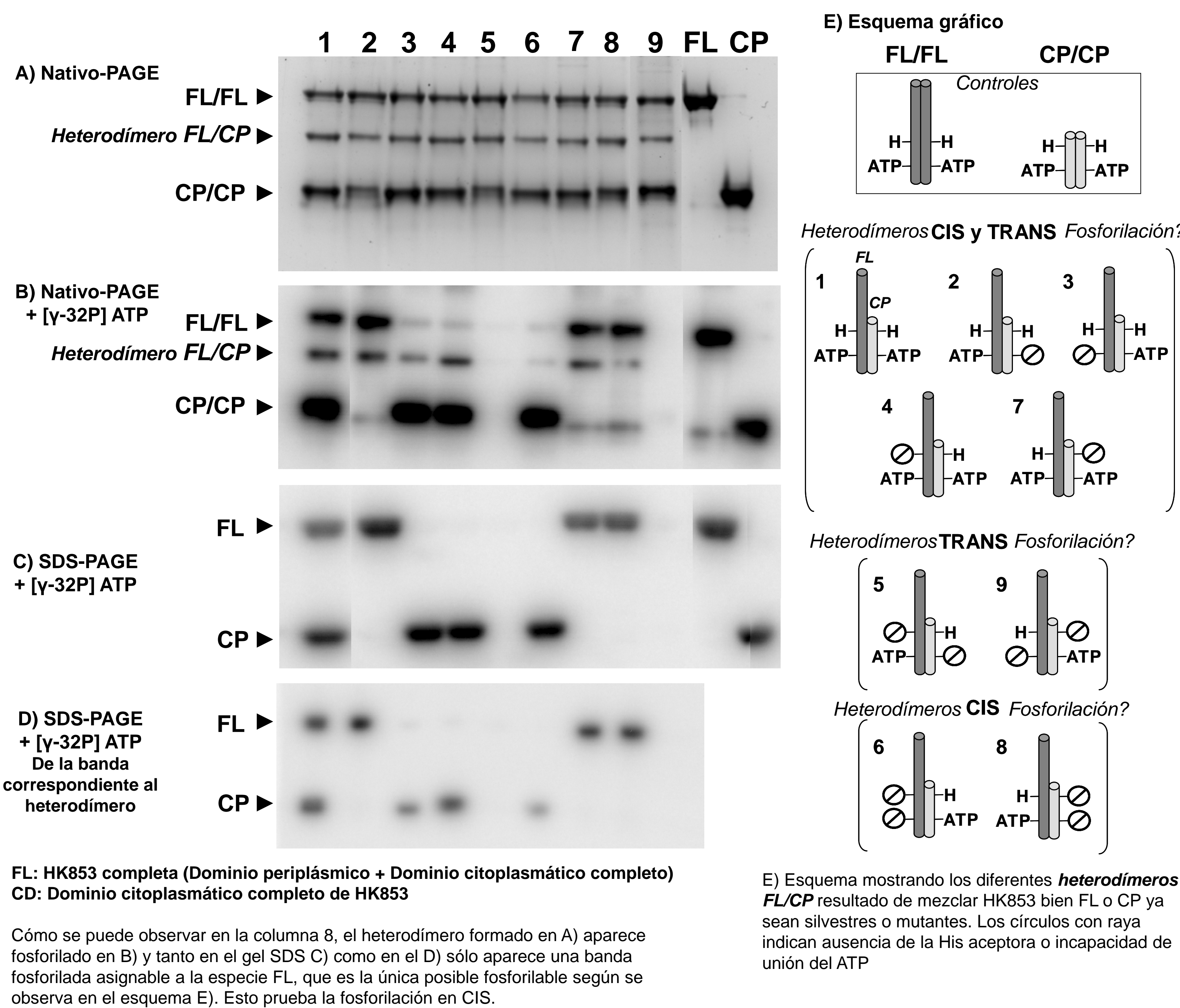
1) El centro catalítico del complejo está formado por todos los residuos conservados del dominio aceptor del RR así como por la His aceptora de la HK. La posición adoptada por los residuos del RR (D9, D10, D53, T83 y K105) añadida a la presencia del sulfato y el Mg sugiere que estamos observando la conformación fosforilada de RR468.

2) Si modelamos dentro de una misma subunidad otra conformación para la His aceptora (II), así como el fosfato y en el ADP (ambos en semitransparente), vemos que la distancia entre ambos es de 6.0 Å. Distancia que sugiere una autofosforilación dentro de una misma subunidad, es decir, en modo CIS.

HK853_{CP} es homodimérica y está formada por dos subunidades A (azul) y B (cian). RR468 contiene un sólo dominio correspondiente al aceptor. Moléculas C y D.

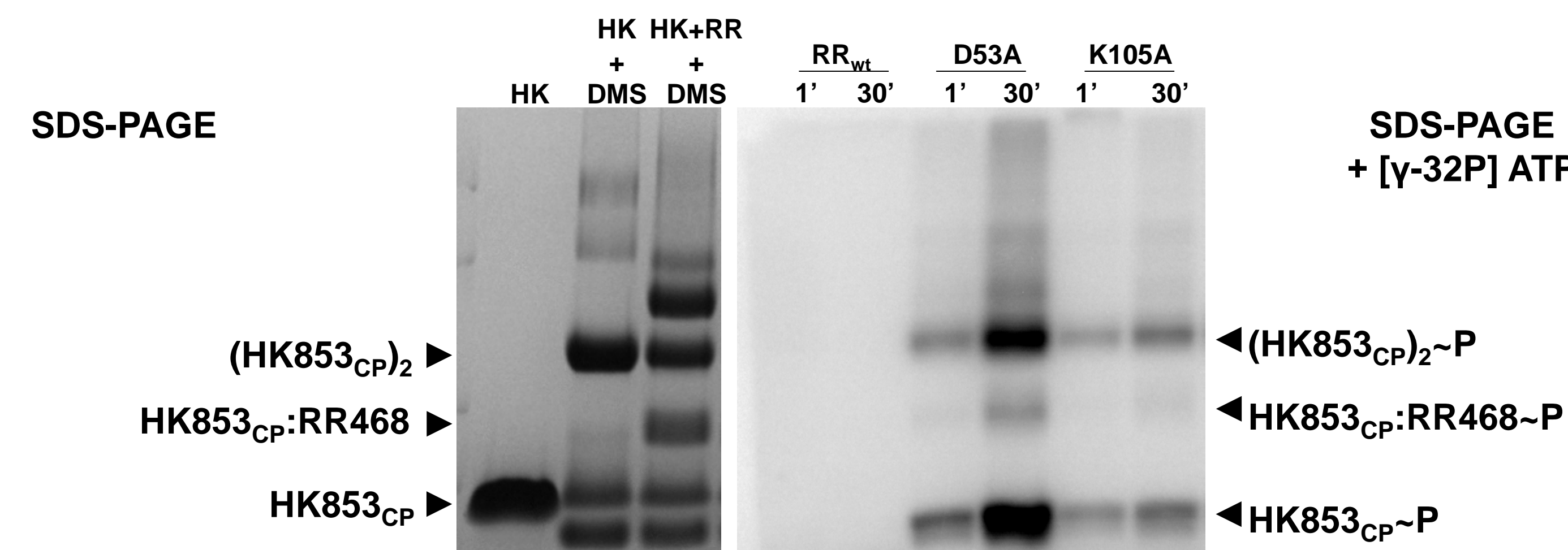
LA REACCIÓN DE AUTOFOSFORILACIÓN EN HK853 SE REALIZA DENTRO DE UNA MISMA SUBUNIDAD (MODO CIS) AL CONTRARIO QUE EN LAS HKs MODELO NtrB y EnvZ, DONDE SE REALIZA ENTRE SUBUNIDADES (MODO TRANS)

Ensayos bioquímicos realizados con varias combinaciones de HK853 completa (HK853_{FL}) y HK853_{CP} tanto silvestres como mutantes (sin His aceptora o sin capacidad de unir ATP) de forma que formáramos heterodímeros FL/CP, han demostrado que la reacción de autofosforilación en esta HK se realiza de modo CIS, dentro de una misma subunidad, apoyando los datos estructurales.



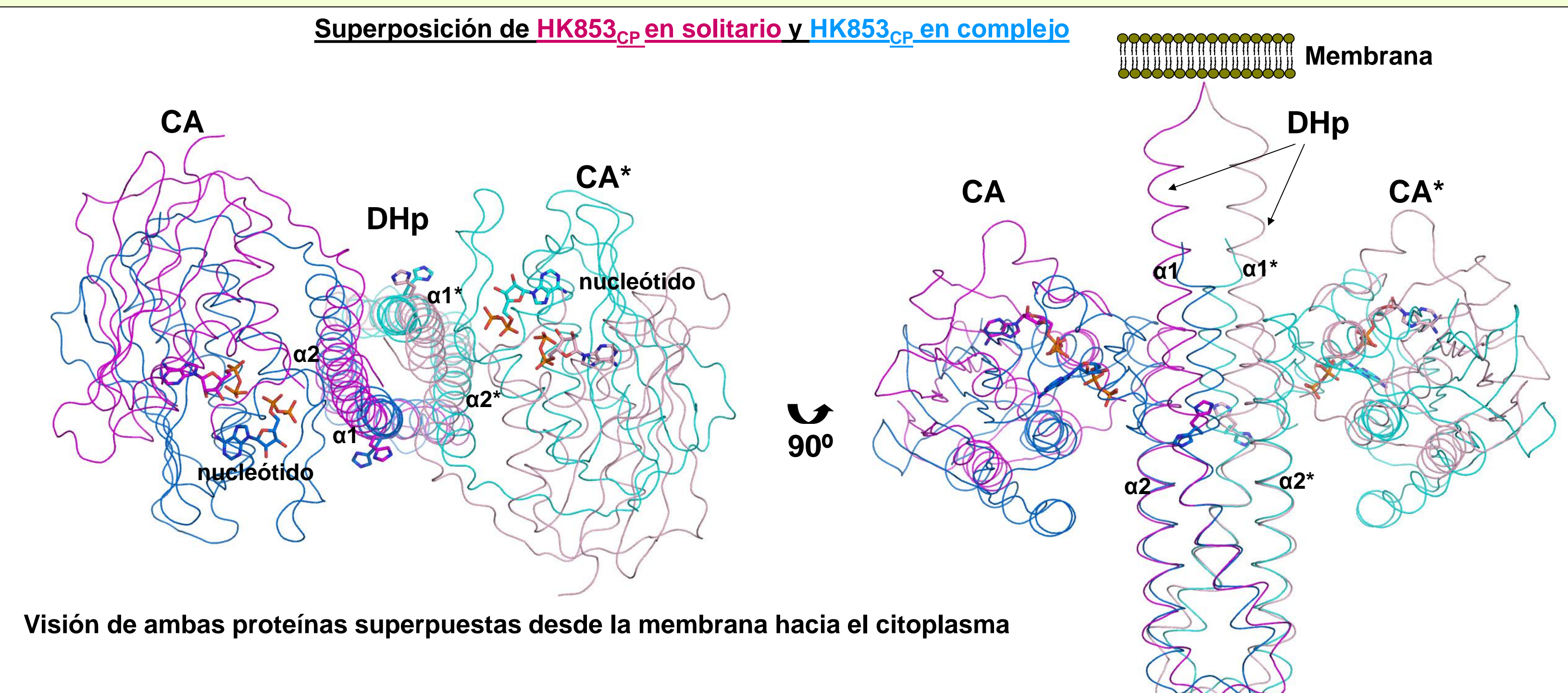
EN HK853_{CP} LA CONFORMACIÓN DE AUTOFORILACIÓN Y DE FOSFOTRANSFERENCIA SE ENCUENTRAN MUY PRÓXIMAS

Ensayos de entrecruzamiento entre HK853_{CP} y RR468 tanto silvestre como mutante (D53A y K105A) utilizando el entrecruzador DMS, han demostrado que el complejo HK853_{CP}:RR468-D53A puede autofosforilarse estando éste entrecruzado. También prueba que el complejo HK853_{CP}:RR468 silvestre puede fosfotransferir y defosforilar estando entrecruzado. Esto prueba que las conformaciones de fosfotransferencia y de defosforilación observadas en la estructura del complejo están muy cercanas a la de *cis*-autofosforilación que fue deducida de esta misma estructura.



MOVIMIENTOS QUE PERMITEN ADQUIRIR LOS DIFERENTES CAMBIOS CONFORMACIONALES

La superposición de las estructuras de HK853_{CP} en solitario (morado) y HK853_{CP} en complejo (azul) nos permite observar cambios conformacionales en los dos dominios citoplasmáticos DHP (haz de cuatro hélices formado por α1 (contiene la His260 fosforilable) y α2 que dimerizan α1* y α2*) y CA (dominio globular unido al DHP por α2 y que une el nucleótido) de cada subunidad. Estos cambios debe ser similares a los inducidos por la señal a la hora de controlar las diferentes reacciones del sistema.



La conexión entre las porciones citoplasmática y extracelular (donde la señal llega) se realiza por la hélice α1 del DHP. Al comparar ambas estructuras de HK853_{CP} observamos que la parte de α1 más cercana a la membrana rota ~20° obligando a rotar a α2 ~10° a la vez que ambas hélices se desplazan ~4 Å. Dichos movimientos van disminuyendo hasta casi anularse en la Pro265 de α1, residuo que actuaría como bisagra. El dominio CA se asienta en α1 y α2, por lo que dichos movimientos afectan a la superficie de interacción entre DHP y CA provocando una rotación de CA de ~37° acercando la His aceptora a dicho dominio. De esta forma, la disposición relativa de los dominios DHP y CA, modulada por la señal, controlaría la autofosforilación y la fosfotransferencia.

